

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-104628

(43) 公開日 平成8年(1996)4月23日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/35	AED			
	AAG			
	ABE			
	ADU			

// C 0 7 D 311/30

審査請求 未請求 請求項の数7 FD (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-266264

(22) 出願日 平成6年(1994)10月4日

(71) 出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72) 発明者 熊谷 和夫

大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住

友製薬株式会社内

(72) 発明者 藤原 扶美

大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住

友製薬株式会社内

(72) 発明者 根来 尚温

大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住

友製薬株式会社内

最終頁に続く

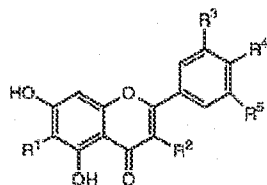
(54) 【発明の名称】 マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤

(57) 【要約】

【目的】 変形性関節症、慢性関節リウマチ、癌細胞の転移または歯肉炎等の予防・治療剤であるマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤を提供する。

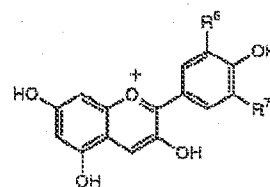
【構成】 フラボン類またはアントシアニジン系を有効成分として含有するマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。フラボン類は、例えば式

【化1】



で表され、アントシアニジンは、例えば式

【化2】



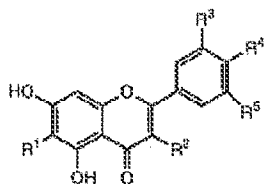
で表される。式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup> および R<sup>7</sup> は、各々独立して、水素原子または水酸基である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フラボン類またはアントシアニジンを含む有効成分として含有するマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

【請求項2】 フラボン類が一般式

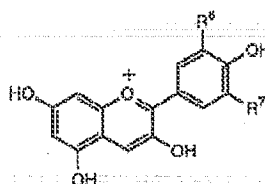
【化1】



(R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup> および R<sup>5</sup> は、各々独立して、水素原子または水酸基である)で表わされる化合物である請求項1記載のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

【請求項3】 アントシアニジンが一般式

【化2】



(R<sup>6</sup> および R<sup>7</sup> は、各々独立して、水素原子または水酸基である)で表わされる化合物である請求項1記載のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

【請求項4】 フラボン類またはアントシアニジンが、バイカレイン、ミリセチン、クリシン、アビゲニン、ルテオリン、6-ヒドロキシルテオリン、ケンフェロール、クエルセチン、クエルセタゲニン、スクテラレイン、シアニジン、デルフィニジンおよびペラルゴニンからなる群より選ばれる化合物である請求項1記載のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

【請求項5】 フラボン類またはアントシアニジンが、バイカレイン、ミリセチン、シアニジンおよびデルフィニジンからなる群より選ばれる化合物である請求項1項記載のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

【請求項6】 フラボン類またはアントシアニジンを含む製剤が、オウゴンまたはヨウバイヒの抽出エキスを含有する製剤である請求項1項記載のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

【請求項7】 変形性関節症、慢性関節リウマチ、癌細胞の転移または歯肉炎の予防もしくは治療剤である請求項1～6項記載のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規なマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤に関する。さらに詳しくは、

本発明は、マトリックスメタロプロテアーゼによる細胞外マトリックスの分解によって引き起こされる変形性関節症や慢性関節リウマチ等の関節疾患、癌細胞の転移、歯肉炎等の治療および予防に有用である新規なマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 哺乳動物の結合組織はコラーゲンやプロテオグリカンなどを成分とする細胞外マトリックスにより構成されている。細胞外マトリックスの代謝は、これを分解する酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼと、その生体内阻害因子であるTIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) とのバランスにより主に調節されている。マトリックスメタロプロテアーゼと生体内阻害因子とのバランスが崩れ、マトリックスメタロプロテアーゼが過剰の状態になると、細胞外マトリックスの分解が亢進する。変形性関節症や慢性関節リウマチなどの関節疾患、癌細胞の転移、歯肉炎等では病態の進行と種々のマトリックスメタロプロテアーゼ活性の上昇とが相関していることが知られている。例えば、変形性

関節症および慢性関節リウマチではストロメライシンが (J. Martel-Pelletier ら, Arthritis Rheum. 27, 305-312, 1984; D.D. Dean ら, J. Clin. Invest. 84, 678-685, 1989)、癌細胞の転移ではゼラチナーゼが (L. A. Liotta ら, Nature 284, 67-68, 1980)、歯肉炎ではコラゲナーゼが (K. Suomalainen ら, Oral. Microbiol. Immunol. 6, 24-29, 1991)、それぞれ病態の進行と密接に関わっていることが知られている。従って、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤は、変形性関節症および慢性関節リウマチ等の関節疾患、癌細胞の転移、歯肉炎等の治療または予防剤として有用である。

【0003】 マトリックスメタロプロテアーゼとしては、コラゲナーゼ (MMP-1)、ゼラチナーゼAおよびB (MMP-2および9)、ストロメライシン (MMP-3) など、これまでに10種類の酵素分子種が知られている (吉原と新名, 炎症と免疫, 2, 177-185, 1994)。これらのマトリックスメタロプロテアーゼに対する阻害剤としては、ヒドロキサム酸基を有するペプチド性化合物等がこれまでに合成されているものの、活性、体内での吸収、毒性等を考慮すると、新しいマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤が望まれている。フラボノイド類の化合物は、5- $\alpha$ -リダクターゼに対する阻害作用 (特開平1-96126)、レトロウイルスの逆転写酵素に対する阻害作用 (特開平1-163120、特開平1-163121、特開平1-163122)、 $\beta$ -グルクロニダーゼに対する阻害作用 (WO93-02684)、ATPアーゼに対する阻害作用 (特開平5-97705)、トリプシンに対する阻害作用 (特開平5-85934) などが知られているが、マトリックスメタロプロテアーゼに対する阻害作用は知られていない。

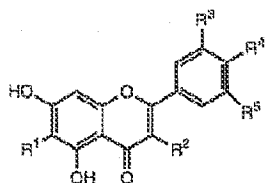
【0004】

【発明が解決しようとする課題】このような状況において、マトリックスメタロプロテアーゼに対する低分子阻害剤の開発が求められている。

【0005】

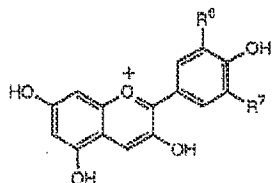
【課題を解決するための手段】本発明のマトリックスメタロプロテアーゼ剤は、有効成分としてフラボン類およびアントシアニン類からなる群から選ばれる化合物を含むことを特徴とする。フラボン類およびアントシアニンは、各々、フラボノイドと総称されるC<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>炭素骨格をもつ一群の植物色素に属する化合物群であり、遊離あるいは配糖体として植物の組織に広く存在する。本発明においては、フラボン類またはアントシアニンは植物から抽出単離したものが市販されているので、それを用いればよいが、もちろん合成した化合物であってもよく、また、これらの化合物を成分として含む生薬抽出エキスをを用いてもよい。

【0006】フラボン類としては、例えば一般式【化3】



(R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup> および R<sup>5</sup> は、各々独立して、水素原子または水酸基である)で表わされる化合物を用いることができる。そのような化合物としては、例えばバイカレイン、ミリセチン、クリシン、アピゲニン、ルチオリン、8-ヒドロキシルチオリン、ケンフェロール、クエルセチン、クエルセタゲニン、スクテラレイン等が挙げられ、中でも、バイカレインおよびミリセチンが好ましい。バイカレインはオウゴンに含まれる成分として、ミリセチンはヨウバイヒに含まれる成分としてそれぞれ知られる公知のフラボン類である。

【0007】アントシアニン類としては、例えば一般式【化4】



(R<sup>6</sup> および R<sup>7</sup> は、各々独立して、水素原子または水酸基である)で表わされる化合物を用いることができる。上記式で表されるオキソニウム塩のカウンターイオンとしては、塩素イオンが好ましい。アントシアニン類としては、さらに具体的には、例えばシアニン、デルフィニン、ペラルゴニン等が挙げられ、中でも、シアニンおよびデルフィニンが好ましい。シアニンはシュウマツリ等の生薬に含まれる成分として、デルフ

ィニンはトウジンチ等の生薬に含まれる成分としてそれぞれ知られる公知のアントシアニンである。

【0008】フラボン類またはアントシアニンを成分として含む生薬としては、例えばオウゴン、ヨウバイヒ等を挙げることができる。オウゴンはコガネバナ (*Scutellaria baicalensis* Georg.) の周皮を除いた根を乾燥したものである。ヨウバイヒはヤマモモ (*Myrica rubra* Sieb. et. Zucc.) の樹皮を乾燥したものである。その他の生薬としては、例えばモッコショウ、ゲンカ、イレイセン、カンシンソウ、キョウレイソウ、アンヨウ、イッシンコウ、クジャクソウ等が挙げられる。生薬抽出エキスは、これらの生薬を、例えばメタノール、酢酸エチル等の有機溶媒で抽出することにより得ることができる。

【0009】フラボン類およびアントシアニン化合物の合成法としては、例えば Sastri, Seshadri, Proc. Ind. Acad. Sci., 23A, 262, 1946 および King, White, J. Chem. Soc., 1957, 3901 等に記載の方法が知られている。

【0010】本発明のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤は、フラボン類、アントシアニンまたは生薬抽出エキスを、それぞれ単独で、あるいは組み合わせ、公知の医薬用担体と共に製剤化して、錠剤、粉剤、顆粒剤、液剤等の経口剤や、注射剤、点滴剤等の非経口剤、さらには坐薬等として用いることができる。医薬用担体は、投与形態および剤形に応じて選択することができ、各種の賦形剤、界面活性剤、滑沢剤、懸濁剤、湿潤剤、および医薬的に許容しうる皮膜形成物質等が用いられる。賦形剤としては、例として、ショ糖、乳糖、デンプン、結晶性セルロース、マンニット、軽質無水珪酸、アルミン酸マグネシウム、メタ珪酸アルミン酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム等があげられる。界面活性剤としては、例として、アルコール、エステル類、ポリエチレングリコール誘導体、ソルビタンの脂肪酸エステル類、硫酸化脂肪酸アルコール類があげられる。滑沢剤としては、例として、ステアリン酸マグネシウム、タルク、硬化油等があげられる。懸濁剤、湿潤剤としては、例として、ココナツ油、オリーブ油、ゴマ油、落花生油、乳酸カルシウム、紅花油、大豆リン脂質等があげられる。皮膜形成物質としては、例として、酢酸フタル酸セルロース等の炭水化物誘導体、アクリル酸メチル、メタアクリル酸メチル等のアクリル酸系共重合体、メタアクリル酸系共重合体等があげられる。また、矯味剤、矯臭剤として、食塩、サッカリン、糖、マンニット、オレンジ油、カンゾウエキス、クエン酸、ブドウ糖、メントール、ユーカリ油、リンゴ酸等の甘味料、香料、着色料、保存剤を含有させてもよい。

【0011】投与量は、投与方法と患者の年齢、体重、病状等により一定したものではないが、経口投与の場合は、通常、成人の1日当たり投与量は有効成分であるフラボン類およびアントシアニン化合物の量として1〜

1000mgの範囲で選択すればよい。

【0012】

【発明の効果】本発明のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤はマトリックスメタロプロテアーゼに対し優れた阻害活性を示し、例えば変形性関節症および慢性関節リウマチ等の関節疾患、癌細胞の転移、歯肉炎等の治療および予防に有用である。

【0013】

【実施例】次に本発明の実施例を示すが、この実施例は単なる一例を示すものであって、本発明を限定するものではない。

#### 実施例1

##### マトリックスメタロプロテアーゼに対する阻害活性の測定

ストロメライシンは、公知のヒトストロメライシン(MMP-3)の遺伝子塩基配列(P. Bassetら、Nature 348, 699-704, 1990)に基づき遺伝子工学的に調製し、1mMの4-アミノフェニルマーキュリクアセテート(APMA)存在化にて37℃で1.6時間保持することにより活性化したものを用いた。バイカレイン(和光純薬工業製)、ミリセチン(Aldrich社製)、デルフィニジン(Extrasynthese社製)、シアニジン(Extrasynthese社製)は市販品を用いた。

【0014】ヒトストロメライシンに対する阻害活性の測定は、[Nle]-substance P (Sigma社製)を酵素反応の基質として用いる以下の方法によった。すなわち、20μlの活性化済みヒトストロメライシンと、40μlのアッセイバッファー(100mMトリス塩酸、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化カルシウム、0.05%ブリーチ-35、pH7.5)に溶解した被験化合物とを混合し、これに20μlの基質液(アッセイバッファーに溶解して3mMとした[Nle]-substance P)を加え、37℃で4時間保持して反応させた後、80μlの10mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を加えて反応を停止させた。この液10μlを逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に注入し、酵素反応により生成したペプチド断片(L-フェニルアラニル-L-フェニルアラニル-グリシル-L-ロイシル-L-ノルロイシナムド)量を定量することにより、ヒトストロメ

\*ライシンに対する阻害活性を求めた。なお、逆相HPLCの条件は次のとおりとした。カラム、YMC-Pack A-203 C8(4.6×250mm)(ワイエムシー製)；移動相、0.1%のTFAを含有する33%アセトニトリル；流速、1ml/分；検出、215nmにおける吸光度。

【0015】コラゲナーゼに対する阻害活性の測定は、基質として蛍光合成基質の(7-メトキシクマリン-4-イル)アセチル-L-プロリル-L-ロイシル-グリシル-L-ロイシル-L-[N-(2,4-ジニトロフェニル)-L-2,3-ジアミノプロピオニル]-L-アラニル-L-アルギニンアミド(MCA)(ペプチド研究所製)を用いる以下の方法によった。すなわち、20μlの活性化済みヒトコラゲナーゼ(MMP-1)

(0.5U/ml、ヤガイ製)と、40μlのアッセイバッファーに溶解した被験化合物とを混合し、これに20μlの基質液(アッセイバッファーに溶解して80μMとしたMCA)を加え、37℃にて2.4時間保持して反応させた後、80μlの10mMのEDTAを加えて反応を停止させた。この液50μlを逆相HPLCに注入し、残存MCA量を定量することにより、ヒトコラゲナーゼに対する阻害活性を求めた。なお、逆相HPLCの条件は次のとおりとした。カラム、YMC-Pack A-203 C8(4.6×250mm)(ワイエムシー製)；移動相A液、0.1%のトリフルオロ酢酸(TFA)；移動相B液、0.1%のTFAを含有するアセトニトリル；グラジエント、B液濃度27%~57%まで30分のリニアグラジエント；流速、1ml/分；検出、330nmにおける吸光度。

【0016】ゼラチナーゼに対する阻害活性の測定は、ヒトコラゲナーゼの代わりに活性化済みヒトゼラチナーゼB(MMP-9)(0.5U/ml、ヤガイ製)を用いた以外はヒトコラゲナーゼに対する阻害活性の測定の場合と同様の方法によった。

【0017】酵素阻害活性の測定結果を表1に示す。50%阻害濃度(IC50)は22~150μg/mlであり、マトリックスメタロプロテアーゼに対する強い阻害活性が認められた。

【表1】

化合物	IC50 (μg/ml)		
	ストロメライシン	コラゲナーゼ	ゼラチナーゼB
バイカレイン	30	25	34
ミリセチン	95	24	28
デルフィニジン	47	28	34
シアニジン	150	22	22

【0018】実施例2

50 生薬抽出エキスの調製

市販生薬を乾燥、粉碎した後、10gの各生薬に対し100mlのメタノールを加え、還流下にて2時間加熱抽出した。抽出液を濾過し、濾液を減圧濃縮後、乾燥し、メタノール抽出エキスを得た。さらにこれを、100mlの蒸留水と100mlの酢酸エチルと共に振盪抽出し、酢酸エチル層を回収して減圧濃縮後、乾燥し、酢酸エチル抽出エキスを得た。

#### 【0019】実施例3

#### 生薬抽出エキスのマトリックスメタロプロテアーゼに対する阻害活性の測定

ヒトストロメライシンに対する酵素阻害活性の測定はMCAを基質とする以下の方法によった。すなわち、活性化済みヒトストロメライシン250 $\mu$ l (29nM)と、500 $\mu$ lのアッセイバッファーに溶解した生薬エキスを混合し、これに250 $\mu$ lの基質液(アッセイ\*

＊バッファーに溶解して40 $\mu$ MとしたMCA)を加え、37℃にて2時間保持して酵素反応させた。生薬抽出エキスの代わりにアッセイバッファーを加えた場合を対照として、反応前後の蛍光強度(励起波長320nm、蛍光波長405nm)からヒトストロメライシンに対する阻害活性を求めた。また、ヒトコラゲナーゼ、ヒトゼラチナーゼBに対する阻害活性の測定は実施例1と同様の方法によった。

【0020】表2に生薬抽出エキスのマトリックスメタロプロテアーゼに対する阻害活性を示す。なお、ヒトストロメライシンに対する阻害活性は生薬抽出エキスの終濃度を50 $\mu$ g/ml、ヒトコラゲナーゼとヒトゼラチナーゼBに対する阻害活性は生薬抽出エキスの終濃度を100 $\mu$ g/mlとして測定した。

【表2】

生薬	エキスの分類	各酵素に対する阻害活性(%)		
		ストロメライシン	コラゲナーゼ	ゼラチナーゼB
オウゴン	A	64.2	55.1	39.1
ヨウバイヒ	M	55.7	39.9	35.6

(注) エキスの分類: Aは酢酸エチル抽出エキス、Mはメタノール抽出エキスを表わす。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>8</sup>  
C07D 311/60

識別記号 片内整理番号

F I

技術表示箇所

(72)発明者 金岡 昌治  
大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内

(72)発明者 佐治 幾太郎  
大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成14年1月15日(2002.1.15)

【公開番号】特開平8-104628

【公開日】平成8年4月23日(1996.4.23)

【年通号数】公開特許公報8-1047

【出願番号】特願平6-266264

【国際特許分類第7版】

A61K 31/35 AED

AAG

ABE

ADU

// C07D 311/30

311/60

【F1】

A61K 31/35 AED

AAG

ABE

ADU

C07D 311/30

311/60

【手続補正書】

【提出日】平成13年10月1日(2001.10.

1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

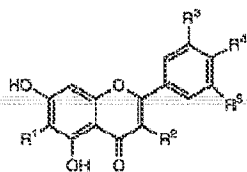
【補正方法】変更

【補正内容】

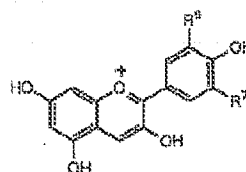
【特許請求の範囲】

【請求項1】フラボン類またはアントシアニジンを含む有効成分として含有するマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

【請求項2】式：



で表わされる化合物、または式：



で表わされる化合物を有効成分として含有する請求項1記載のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

【R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>およびR<sup>7</sup>は、各々独立して、水素原子または水酸基である。】

【請求項3】フラボン類またはアントシアニジンが、バイカレイン、ミリセチン、クリシン、アピゲニン、ルテオリン、6-ヒドロキシルテオリン、ケンフェロール、クエルセチン、クエルセタゲニン、スクテラレイン、シアニジン、デルフィニジンおよびペラルゴニジンからなる群より選ばれる化合物である請求項1項記載のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

【請求項4】フラボン類またはアントシアニジンを含む製剤が、オウゴンまたはヨウバイヒの抽出エキスを含有する製剤である請求項1項記載のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

【請求項5】マトリックスメタロプロテアーゼが、MMP-1、MMP-2、MMP-3またはMMP-9である請求項1～4のいずれか記載のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

【請求項6】マトリックスメタロプロテアーゼによる

細胞外マトリックスの分解によって引き起こされる関節疾患、または癌細胞の転移、または歯肉炎の予防もしくは治療剤である請求項1～5項記載のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

【請求項7】 マトリックスメタロプロテアーゼによる

細胞外マトリックスの分解によって引き起こされる変形性関節症または慢性関節リウマチの予防もしくは治療剤である請求項1～5のいずれか記載のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-104628

(43)Date of publication of application : 23.04.1996

(51)Int.Cl.

A61K 31/35  
A61K 31/35  
A61K 31/35  
A61K 31/35  
// C07D311/30  
C07D311/60

(21)Application number : 06-266264

(71)Applicant : SUMITOMO PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 04.10.1994

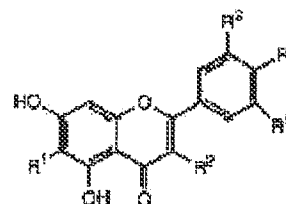
(72)Inventor : KUMAGAI KAZUO  
FUJIWARA FUMI  
NEGORO TAKAATSU  
KANEOKA SHOJI  
SAJI KITARO

## (54) INHIBITOR OF MATRIX METALLOPROTEASE

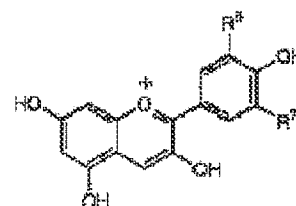
(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a new inhibitor of a matrix metalloprotease useful for treating and preventing articular diseases, metastasis of cancerous cells and gingivitis, etc., by using a compound selected from the group of flavones and anthocyanidin as an active ingredient.

CONSTITUTION: This new inhibitor a matrix metalloprotease contains flavones of formula I (R1 to R5 are each H or OH) or an anthocyanidin of formula II (R6 and R7 are each H or OH) as an active ingredient. The flavones or anthocyanidin herein used are preferably selected from the group of baicalein, myricetin, chrysin, apigenin, luteolin, 6-hydroxyluteolin, kaempferol, quercetin, quercetagenin, scutellarein, cyanidine, delphinidin and pelargonidin. The medicine is effective against diseases caused by the decomposition of an extracellular matrix with the matrix metalloprotease.



I



II